

人工ルーメンにおける粗繊維発酵の微生物学的および動力学的解析

著者	李 垠
号	361
発行年	1986
URL	http://hdl.handle.net/10097/16230

氏 名(本籍)	李 ^う 垠 ^ん
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	農 博 第 361 号
学位授与年月日	昭和 62 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 畜 産 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	人工ルーメンにおける粗繊維発酵の 微生物学のおよび動力学的解析

論文審査委員 (主 査)

教授 堀 口 雅 昭	教授 津 田 恒 之
	教授 勝 野 正 則

論文内容要旨

人工ルーメンにおける粗繊維発酵の 微生物学および動力学的解析

I 章 緒 論

反芻動物による飼料の利用性は、反芻胃内における飼料の微生物発酵の程度に大きく依存している。セルロースや非蛋白態N化合物に富む飼料は、反芻胃内に滞留する時間が十分長く、揮発性脂肪酸や微生物体蛋白質に変換されれば、宿主動物による利用性は高まる。良質の蛋白質やデンプンに富む飼料は微生物の作用をバイパスし、早く下部消化管に移行した方が利用性が高い。

反芻胃内における飼料の微生物発酵を規定する要因は、互に複雑に関連しているが、飼料の栄養素組成に代表される化学的要因と、飼料粒子のサイズ、摂取量と摂取速度、唾液分泌速度等の物理的要因に2大別される。従来、これらの要因と飼料の発酵との関係については、*in vivo*, *in vitro* を問わず、微生物学的な検討と物質的な検討とが別個に行われ、また各要因についても単独の効果が明らかにされているに過ぎない。

そこで、本研究では、連続培養型人工ルーメンを用い、基質としての粗飼料の質、基質の添加速度および人工唾液の添加速度の3要因を変化させ、基質の分解と発酵産物の生成および微生物相を調べ、粗飼料の胃内発酵に対するこれらの3要因の総合効果を明らかにしようとした。

II 章 基礎基質としての稲ワラの発酵

羊の反芻胃微生物を接種した500ml容の培養槽に、塩類液(人工唾液)を希釈率1.5/日(750ml/日)で、また、基礎基質として稲ワラ粉末(0.5mm)と、これにとうもろこしデンプンと尿素を添加した基質を22.5g/日(人工唾液に対する濃度30g/l)の割合で連続的に添加した。槽流出物のpH、固形物、VFA(揮発性脂肪酸)、原虫数等は3~4日で定常状態に達した。その後、槽内容物中の細菌と原虫の密度、乾物とセルロースの消化率、流出物中のVFAの濃度と組成を測定した結果、典型的な粗飼料としての発酵結果を与えた(Fig.1)。また、セルロースの消化率は、とうもろこしデンプンの添加でやや低下したが、尿素添加で著増し、微生物の総数とその構成も、物質変化と対応した変化を示した。

これらの結果から、稲ワラを基礎基質として用い、これに尿素およびデンプンを添加することにより、種々の質の粗飼料のモデルとして充分に利用できるものと結論された。

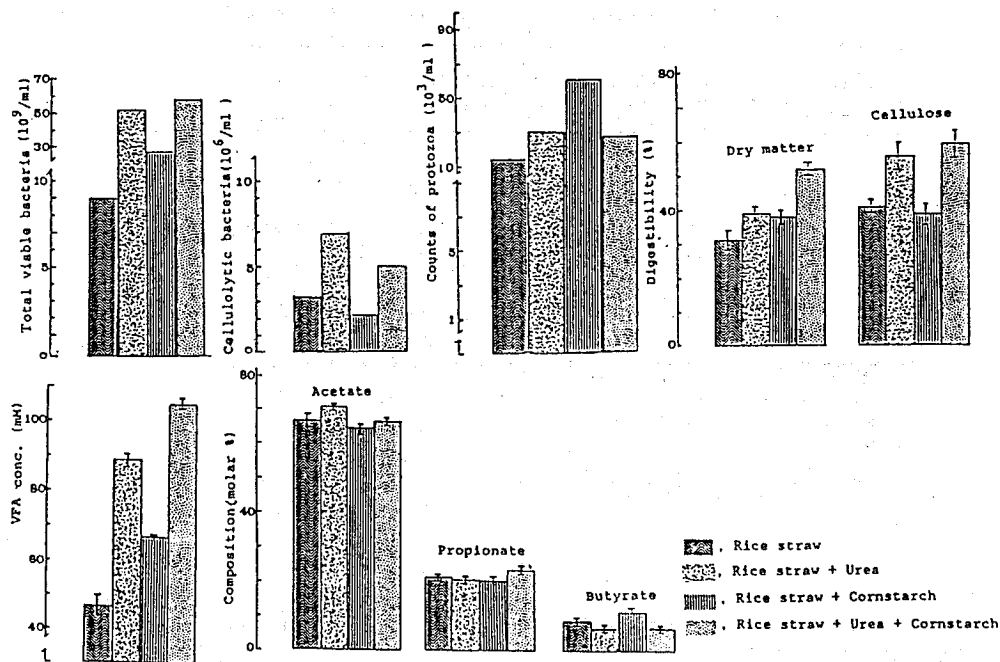


Fig.1 Rumen microbial fermentation of various substrates in continuous culture.

III章 塩類液の添加速度、基質の添加速度および尿素の添加水準が発酵と微生物相におよぼす影響

塩類液の添加速度を3段階（希釈率1.0, 1.5および3.0/日）、基質の添加速度を3段階（添加塩類液に対する基質濃度20, 30および40 g/ℓ）に変化させ、また、稲ワラ粉末に尿素を5水準に添加して、II章と同様に培養した。

その結果、基質添加速度の増加と液の希釈率の増加（代謝回転時間 liquid-turnover time の減少）に伴い、培養槽内の固形粒子のプール、酸不溶性灰分のプール（原物に換算した基質のプール）は増大し、酸不溶性灰分（原物換算基質の固形物）の代謝回転時間（Solid-turnover time）は減少して（Table 1）、難消化性成分の消化率の低下が予想された。セルロース消化率に対する効果は、液の代謝回転時間より固形物の代謝回転時間の方が大きいことは、Fig.2のR+Uに対するセルロース消化率の等高線図と透視図（Fig.3）によりよく示されている。セルロース消化率の等高線図は稲ワラに尿素を添加しない場合（R）と添加した場合（R+U）とで若干異なるが大筋は同じ傾向を示し、またタングステン酸沈澱N（微生物N）の図ともよく似ていた。VFA産生率、微生物密度に関する等高線図は、尿素の有無によって著しく異なった。

Table 1. Effects of liquid-dilution rate and substrate concentration on feed rate and solid-turnover time

Liquid- Dilution rate(d ⁻¹)	Turnover time(h)	Substrate conc. (g/l)	AIA ^a		Pool size(g)		Feed ^d rate (d ⁻¹)	Solid- rate turnover (d ⁻¹)	time(h)
			(g/d)	(g/d)	AIA	substrate ^b DM ^c			
1.0	24	20	1.3	6.7	52	36.2±1.7	0.19	125±2.7	
		30	1.9	9.0	70	37.8±1.4	0.21	113±3.1	
		40	2.6	7.0	55	39.1±2.4	0.36	66±1.4	
1.5	16	20	1.9	8.3	65	39.0±0.9	0.23	104±2.1	
		30	2.9	8.9	69	40.7±1.8	0.32	74±1.9	
		40	3.8	8.6	68	42.8±4.2	0.44	54±1.5	
3.0	8	20	3.8	7.8	61	51.5±3.7	0.49	49±1.8	
		30	5.8	9.8	77	53.4±2.6	0.59	41±2.2	
		40	7.7	9.3	73	57.0±3.2	0.83	29±1.7	

a: AIA (acid insoluble ash) of rice straw was 12.8%.

b: Substrate pool size in the fermentor was calculated from the amount of AIA in the fermentor.

c: Precipitate of centrifugation at 7000xg.

d: Feed rate = $\frac{\text{input of AIA per day}}{\text{amount of AIA in the fermentor}}$

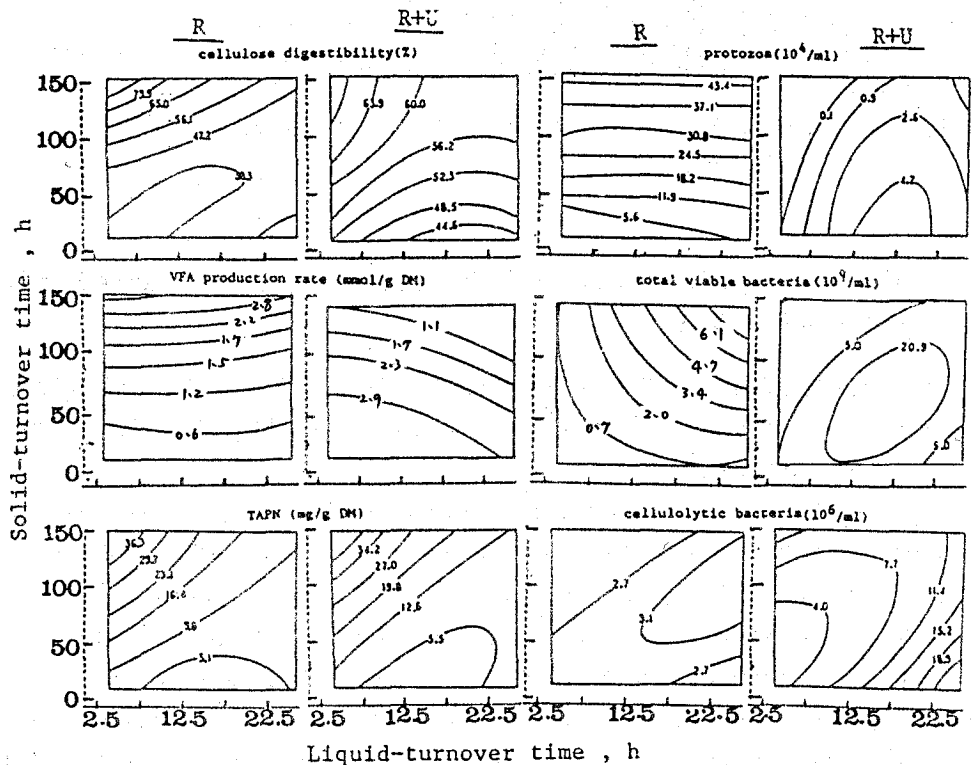


Fig.2 Contour map of fermentation rate and microbial change as functions of liquid- and solid-turnover times in continuous culture fed rice straw(R) or rice straw plus urea(R+U). TAPN, Tungstate precipitable N.

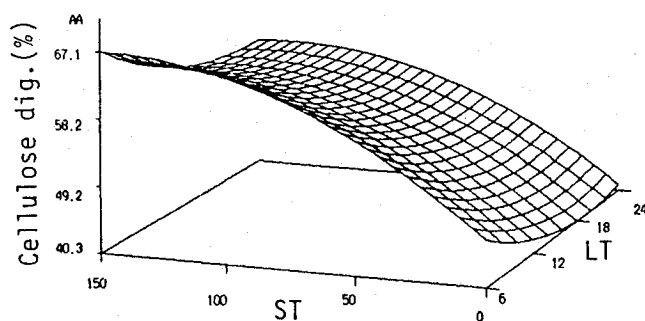


Fig.3 Perspective view of response surface of cellulose digestibility as functions of liquid-turnover time(LT) and solid-turnover time(ST).

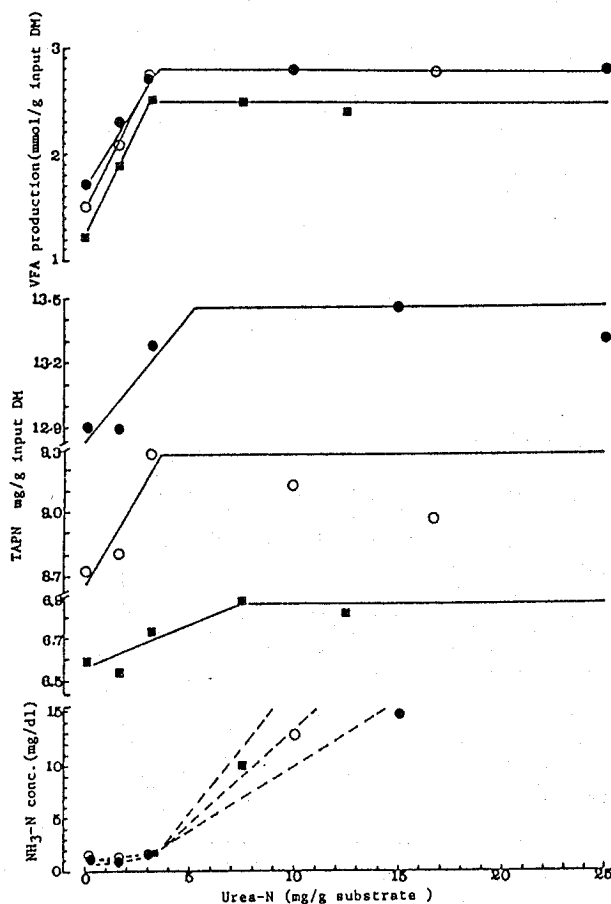


Fig. 4 Effects of urea-N levels on VFA production rate, tungstate precipitable N(TAPN) and $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration in the culture at a dilution rate 1.5/day. Substrate (rice straw) concentration: ●, 20g/l; ○, 30g/l; ■, 40g/l.

反芻胃微生物の多くは、N源として NH_3 を要求し、微生物増殖や発酵産物が最高になるためには、最良の NH_3 -N濃度と NH_3 -N/エネルギー比が存在すると推測されているが、詳細は不明である。Fig.4は、液の希釈率が1.5/日で、VFA産生率とタングステン酸沈澱N(微生物体N)が最高に達する尿素Nと基質の比およびその時に培養液中に蓄積する NH_3 -N濃度を示したものである。VFA産生率は尿素添加水準が約3mgNで基質濃度にかかわらず最高に達したが、その間 NH_3 -Nは1~2mg/dlであった。しかし、タングステン酸沈澱Nの生成率は基質濃度に依存し、尿素添加水準が3~8mgNで最高に達した。セルロース消化率はVFA産生率とよく似た図を示し、また、液の希釈率が1.0および3.0/日の場合の各指標の変化は、1.5/日の場合と同じ傾向を示した。

IV章 塩類液の添加速度、基質の添加速度および尿素添加水準がデンプン添加基質の発酵と微生物相におよぼす影響

良質の粗飼料のモデルとして、基礎基質としての稲ワラに易発酵性のとうもろこしデンプンを重量比で25%添加し、液の添加速度を3段階(希釈率1.0, 1.5および3.0/日)および基質添加速度を3段階(基質濃度20, 30および40g/l), また、尿素を4水準に添加し、前章と同様な検討を行い、細菌構成をさらに詳しく調べた。

液の代謝回転時間および基質固形物の代謝回転時間と、乾物消化率、VFA産生率、または原虫密度との間に有意な相関($P < 0.05$)が認められ、その相関の等高線図(Fig.5)は基質に尿素を添加しない場合と、添加した場合で著しい相違を示した。

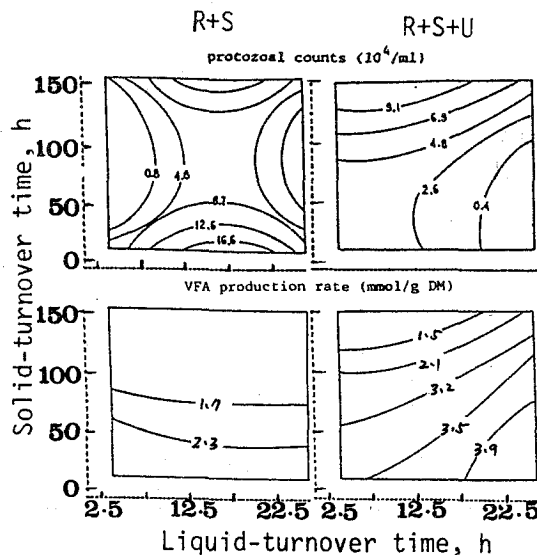


Fig. 5 Contour map of protozoal counts and VFA production rate as functions of liquid- and solid-turnover times in continuous culture.

R+S: Rice straw + cornstarch, R+S+U: rice straw + cornstarch + urea.

液の希釈率が1.5/日の条件下、基質に添加した尿素-N水準と、培養液中に蓄積する $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度、VFA産生率およびタングステン酸沈澱Nの生成率との関係 (Fig. 6) を見ると、稲ワラだけを基質とした場合 (Fig. 4) とは、やや異なった結果が得られ、易発酵性炭水化物添加の効果が明らかに示された。すなわちデンプンの添加により、基質濃度に対するVFA産生率の依存性は高まり、基質濃度の低下に伴い、VFA産生率の増加が顕著になった。

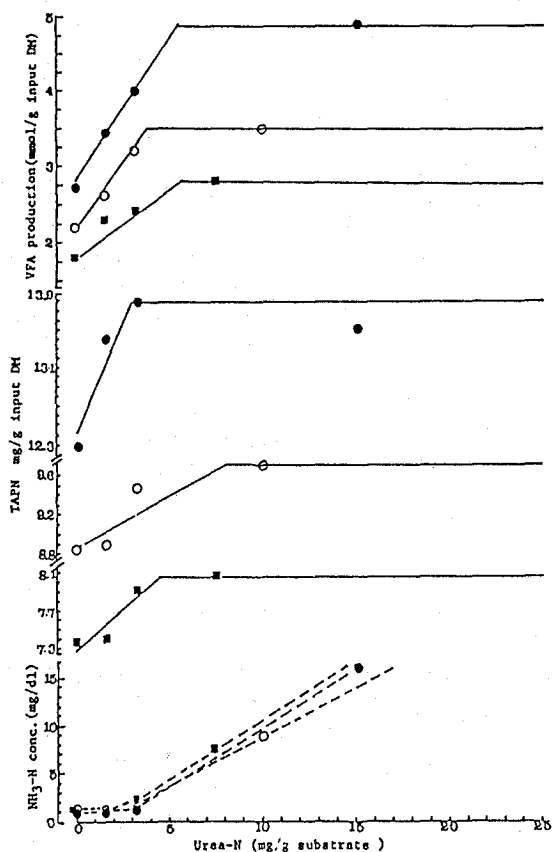


Fig. 6 Effects of urea-N levels on VFA production rate, tungstate precipitable N(TAPN) and $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration in the culture at a dilution rate 1.5/day.

Substrate(rice straw + cornstarch,4:1) concentration :

●,20g/l; ○,30g/l; ■,40g/l.

培養液中の $\text{NH}_3\text{-N}$ の濃度差は逆に減少したが、VFA産生率を最大にする尿素-Nは、タングステン酸沈澱Nの場合と同様、3~8mg/gの範囲にあり、基質濃度が30g/lの条件下、液の希釈率を変化させた場合においてもデンプン添加の効果は顕著になった。

一方、尿素-Nの添加水準と希釈率および基質の濃度の変化に応じて、細菌の増殖 (Fig. 7) とその構成 (Table 2) にも大幅な変化が生じた。

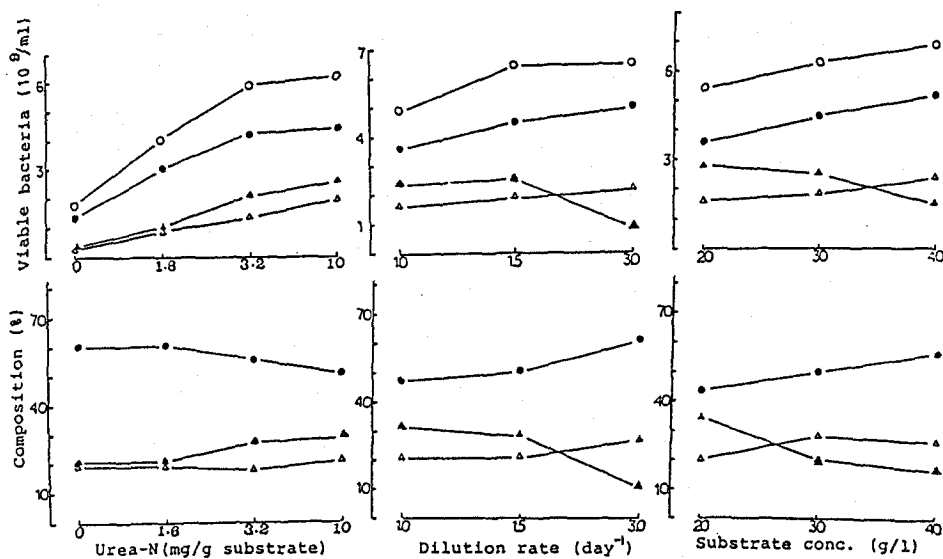


Fig.7 Effects of urea-N levels,dilution rate and substrate concentration on the counts and composition of bacteria.
 ○, Rumen fluid-glucose-cellobiose-starch-agar(RGCSA)medium.
 ●, Rumen fluid-starch-agar(RSA)medium.
 ▲, Rumen fluid-cellobiose-agar(RCA)medium.
 △, Rumen fluid-glucose-agar(RGA)medium.

Table 2. Effects of urea-N levels, dilution rate and substrate concentration on composition(%) of bacteria in continuous culture.

Medium	* Genera	Urea-N (mg/g substrate)				Dilution rate d ⁻¹			Substrate conc.(g/l)		
		0	1.6	3.2	10	1.0	1.5	3.0	20	30	40
RSA	<i>Bacteroides</i>	65	60	55	45	45	45	55	50	45	55
	<i>Succinimonas</i>	10	25	15	30	15	30	15	15	30	25
	<i>Butyrivibrio</i>	ND	10	ND	ND	10	ND	5	5	ND	ND
	<i>Streptococcus</i>	ND	ND	5	ND	5	ND	ND	10	ND	10
	<i>Selenomonas</i>	15	ND	5	ND	ND	ND	10	ND	ND	5
	<i>Others</i>	10	10	20	25	25	25	15	20	25	15
RGA	<i>Bacteroides</i>	25	30	35	35	35	35	50	40	35	15
	<i>Succinimonas</i>	ND	15	5	15	15	15	20	ND	15	15
	<i>Megasphaera</i>	40	35	30	20	25	20	5	30	20	30
	<i>Streptococcus</i>	ND	ND	5	ND	5	ND	ND	15	ND	ND
	<i>Selenomonas</i>	20	10	ND	10	ND	10	5	ND	10	15
	<i>Others</i>	15	10	25	15	20	15	20	15	15	10
RCA	<i>Bacteroides</i>	45	55	40	35	45	35	60	25	35	30
	<i>Ruminococcus</i>	30	25	40	40	40	40	30	55	40	50
	<i>Butyrivibrio</i>	15	15	ND	10	ND	10	ND	5	10	ND
	<i>Others</i>	10	5	20	15	15	15	10	15	15	20

*: RSA,RGA,RCA., see Fig.7.

ND: Not detected.

V 章 塩類液の添加速度と基質の添加速度が発酵におよぼす影響

— 結果の総括 —

Ⅲ章とⅣ章においては、低質粗飼料としての稲ワラと、その質をデンプンおよび尿素の添加により向上させた粗飼料モデルを用い、飼料組成を考慮した条件下で、発酵性を検討した。本章では飼料の組成を無視し、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ章の測定結果を一括して、塩類液の添加速度、基質の添加速度、微生物の量または数、消化率、VFA産生率等の間の関係を等高線図として、検討してみた。その結果 (Fig. 8)、乾物の消化率は液の代謝回転時間が17.5 h、固形物の代謝回転時間が100 h附近で最大値を示し、セルロースの消化率、VFA産生率およびタングステン酸沈澱NについてはⅢ章の結果 (Fig. 2) と類似した結果を与えた。

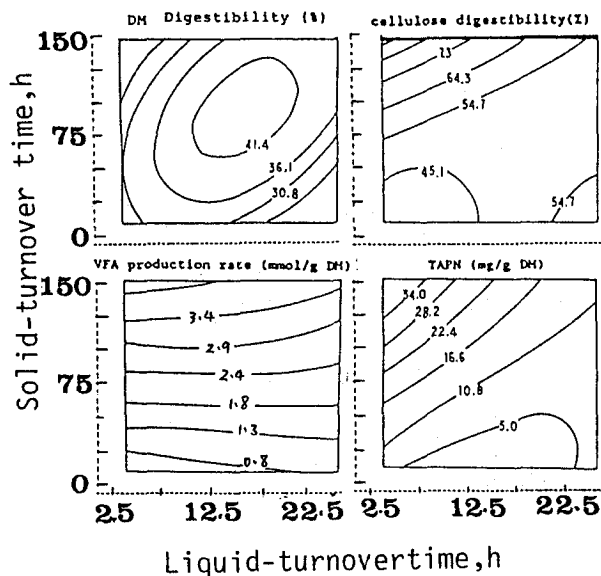


Fig.8 Contour map of fermentation rate as functions of liquid- and solid- turnover times in continuous culture. Basic data were collected from all experiments in Chapter II, III and IV.

培養槽内の細菌および原虫の密度と粗飼料の発酵性との関係を見ると、乾物の消化率とVFA産生率のパターンは類似し、いずれも原虫の密度の影響を大きく受け、また、添加基質の総エネルギーの損失は、細菌と原虫密度の上昇とともに増加する傾向を示した (Fig. 9)。

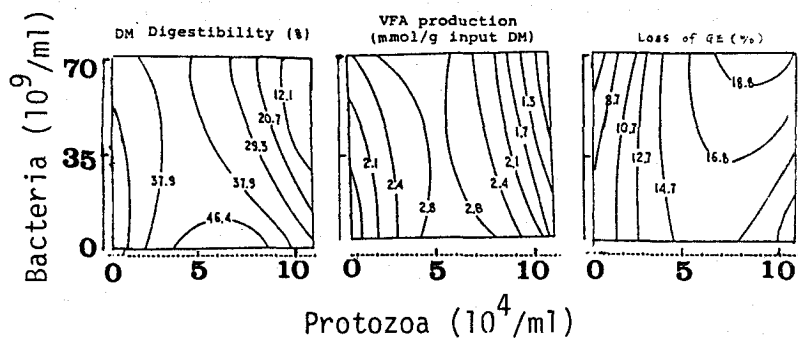


Fig. 9 Contour map of fermentation rate as functions of protozoal density and bacterial density in continuous culture. Basic data were collected from all experiments in Chapter II, III and IV.

VI 章 ま と め

1. 反芻胃微生物の連続培養において、人工唾液の添加速度、基質の添加速度および基質の組成の3条件を変えると、細菌の総数、量、およびその構成、原虫数とその構成は大きく変化した。その結果、乾物とセルロースの消化率、VFA産生率など粗飼料の発酵性も大きく変化した。
2. これらの3条件の変化に対応して、粗飼料の発酵が最大になるために必要な基質のN/エネルギー比、および培養液内の $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度も変化した。
3. これらの解析結果から、粗飼料の微生物消化における化学的および物理的な要因の一部とその重要性が明らかになった。

審 査 結 果 の 要 旨

反芻家畜によって摂取された飼料は、まず、反芻胃内で高度の微生物消化を受けるため、宿主動物が吸収、利用する栄養素は、飼料成分とは著しく異なっている。このような反芻胃内消化の特性は、近年に至り、人工ルーメンを用いて詳細に研究され始めたが、なお不明な点が多い。本研究は、粗飼料の質と摂取量、および唾液分泌量が反芻胃内消化に及ぼす効果を、連続培養型人工ルーメンを用いて調べたものである。

すなわち、著者はまず、稲ワラの発酵に対する尿素、デンプンの添加効果を検討し、粗飼料のモデルとしての稲ワラの特性を検討した。ついで、培養槽への稲ワラの添加速度、人工唾液の注入速度、および尿素添加水準をそれぞれ数段階に取り、これら三要因の変化に伴う微生物の相および増殖量、飼料成分の消化性、揮発性脂肪酸の生成量等の変化を測定し、重回帰分析によって、総合的な効果を検討した。その結果、稲ワラはエネルギーに比してNの含量が不足した粗飼料であるが、微生物体蛋白質収量およびセルロース消化率の向上は、稲ワラの添加速度の減少および人工唾液の注入速度の増加により期待できること、さらに、揮発性脂肪酸の産生率およびプロトゾアの密度は、稲ワラの添加速度と負の相関を示すこと、しかし、このような諸々の効果は、尿素またはデンプンの添加により著しく変化することが明確にされた。これにより、著者は、粗飼料の質と摂取量——細菌とプロトゾアの栄養共生——発酵産物の生成、という反芻胃内消化過程の全体像を描くことに成功した。

以上のように、本研究は反芻胃内消化における飼料の質と摂取速度、唾液分泌速度の重要性について新知見を示し、家畜栄養学の進展に寄与するところ大である。よって著者は農学博士の学位を授与される十分な資格があると判定した。